

1983, 99: 279-283

- [2] Ikebe M, Stepinska M, Kemp BE, et al. Proteolysis of smooth muscle myosin light chain kinase. *Biol Chem*, 1987, 262: 13828-13834
- [3] Carlini JD, Reimann EM. Assay of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Methods Enzymol*, 1974, 38: 287-290
- [4] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248
- [5] Scull J, Hau LC, Tansey MG, et al. Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem*, 1990, 265: 6683-6690
- [6] Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1985, 25: 593-620
- [7] Hsi CM, Murphy RA.  $Ca^{2+}$  cross bridge phosphorylation and contraction. *Ann Rev Physiol*, 1989, 51: 283-298
- [8] Nayler WC, Yepes CE, Poole-Wilson PA. The effect of beta-adrenoceptor and  $Ca^{2+}$  antagonist drugs on the hypoxia-induced increased in resting tension. *Cardiovasc Res*, 1978, 12 (11): 666-674

*Acta Physiologica Sinica*  
Feb. 1998, 50 (1), 82-86

## CHANGES OF ACTIVITIES OF MLCK AND DEPHOSPHATASE IN DIFFERENT ARTERIAL VESSELS FROM HYPERTENSIVE RATS

SUN WEI, WEN YUN-YI, WU GUANG-YU

(Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences,  
School of Basic Medicine, CAMS and PUMC, Beijing 100005)

### ABSTRACT

The changes of activities of myosin light chain kinase (MLCK) and  $Ca^{2+}$ /CaM-PP in different arterial vessels from hypertensive and normotensive rats were studied. The results were as follows. The MLCK activity of different arteries of spontaneous hypertensive rats (SHR) was different with the order of aorta (A) > caudal artery (CA) > mesenteric artery (MA), while in WKY rats the order of activity among different arteries is A < CA and MA and MA  $Ca^{2+}$ /CaM-PP is obviously higher than in SHR. In renal hypertensive rats the activities of  $Ca^{2+}$ /CaM-PP in different arteries are not quite different from those of the Wistar rats. The above results suggest that higher activities of MLCK or/and lower activity might be related to vasoconstriction and hypertension.

Key words: hypertensive rat; myosin light chain kinase;  $Ca^{2+}$ /CaM-dependent protein phosphatase

生理学报, 1998年2月, 50 (1), 87-93

*Acta Physiologica Sinica*

## G蛋白、蛋白激酶C和 $Na^+H^+$ 交换 在内皮素-1诱导培养心肌细胞 肥大反应中的作用\*

吴 滨 王庭槐 潘敬远 朱小南 詹澄扬  
(中山医科大学基础医学研究所, 广州 510089)

**摘 要** 内皮素-1 (ET-1) 是一种强的生长因子, 并诱导心肌细胞肥大反应。在本实验中, 我们探讨了G蛋白、蛋白激酶C (PKC) 和 $Na^+H^+$ 交换在ET-1诱导的培养新生大鼠心肌细胞肥大反应中的作用。ET-1 ( $10^{-10}$  -  $10^{-7}$  mol/L) 促进 $H^+$ 泵泵入, 增加细胞蛋白质的含量和心肌细胞的表面积, 且呈剂量依赖性, 它们的 $EC_{50}$ 分别为 $5.2 \times 10^{-10}$ ,  $5.2 \times 10^{-10}$ 和 $7.3 \times 10^{-10}$  mol/L。用蛋白激酶C (PKC) 抑制剂, Staurosporin ( $2$  mmol/L) 预处理心肌细胞, 可完全阻断ET-1诱导的心肌细胞的这些肥大反应, 而蛋白激酶C激动剂, 佛波醇酯 (PMA) ( $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  mol/L) 呈剂量依赖性促进心肌细胞的肥大反应。用 $Na^+H^+$ 交换抑制剂, 氯胺吡啶 ( $10^{-4}$  mol/L) 预处理心肌细胞, 可抑制ET-1诱导的心肌细胞肥大反应, 但不影响PMA诱导的心肌细胞肥大反应。百日咳毒素 ( $150$  ng/ml) 预处理心肌细胞, 可明显抑制ET-1诱导的心肌细胞肥大反应。这些结果表明, ET-1诱导的培养新生大鼠心肌细胞肥大反应是与百日咳毒素敏感的G蛋白相耦联, 蛋白激酶C和 $Na^+H^+$ 交换可能在ET-1诱导的心肌细胞肥大反应中是重要的细胞内信使转导途径。

**关键词:** 内皮素-1; 蛋白激酶C;  $Na^+H^+$ 交换; G蛋白; 心肌细胞; 肥大反应

内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 是由21个氨基酸组成的活性肽, 首次从猪主动脉内皮细胞分离出来<sup>[1]</sup>, 它对不同种属动物的各种血管均具有强烈的收缩作用, 因此在血压调节和局部血流量调节中可能起重要作用。据报道, 大鼠心肌细胞有ET-1特异性受体<sup>[2]</sup>; 在豚鼠心肌上证实ET-1有正性肌力作用<sup>[3]</sup>; 不仅血管内皮细胞能产生ET-1, 心肌细胞本身也能合成和释放ET-1<sup>[4]</sup>; 最近报道指出, ETA受体拮抗剂BQ-123可阻断压力超负荷引起的左心室肥大<sup>[5]</sup>; 在培养新生大鼠心肌细胞中观察到, ET-1可诱导心肌肥大、增加DNA和蛋白质的合成以及肌肉特异性基因的转录活性和原癌基因c-fos的表达<sup>[6]</sup>。但ET-1引起心肌细胞肥大的信号转导机制尚未完全阐明。本研究旨在培养新生大鼠心肌细胞中, 探讨G蛋白、蛋白激酶C和 $Na^+H^+$ 交换在ET-1诱导心肌细胞肥大反应中的作用。

## 1 材 料 和 方 法

1.1 心肌细胞培养 按Simpson等<sup>[7]</sup>描述的方法培养新生大鼠心肌细胞。分离1~

1997-01-06收稿 1997-01-20修回

\*国家自然科学基金资助项目 (No. 39470810), 高等学校博士点专项基金资助

3 d 龄的 Sprague-Dawley 大鼠心室肌细胞, 用差速贴壁法除去非心肌细胞, 并在培养的最初 2 天, 加入  $0.1 \text{ mmol/L}$  5'-溴脱氧尿苷, 以抑制非心肌细胞生长。

1.2 心肌细胞蛋白含量和细胞直径及面积的测定 将心肌细胞接种于培养瓶 (测定细胞蛋白含量) 或接种于 24 孔培养板 (测定细胞直径和面积) 中, 48 h 后换成无血清培养液, 在 72 h 换成含有干扰因子的无血清培养液, 以后每 2 d 换液一次, 第 9 天收集细胞。用血细胞计数板计数细胞浓度 2 次, 取平均值, 然后加入 1% SDS 溶液溶解心肌细胞膜。用 Lowry's 法测定每瓶心肌细胞的蛋白质总含量, 根据每瓶细胞总数和心肌细胞的蛋白质总含量, 计算出每个心肌细胞的蛋白质含量。

将培养孔的细胞消化后收集细胞, 用图象处理系统 (IBS, Kontron 公司, West Germany) 测定心肌细胞直径和细胞表面积, 每孔测 5 个视野, 每个视野测 5~10 个细胞, 取其平均值。

1.3 测定心肌细胞的  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入 将含细胞浓度为  $2.5 \times 10^4$  个/ml 的心肌细胞接种于 24 孔培养板上, 每孔 1 ml。72 h 换入含  $3.7 \text{ kBq } ^3\text{H}$ -亮氨酸  $50 \mu\text{l}$  和各种干扰因子的无血清培养液, 继续培养 72 h。将细胞收集于玻璃纤维滤膜上。用 10% 三氯醋酸破碎细胞并固定, 用蒸馏水反复冲洗, 以除去游离的同位素标记物。滤膜烘干后置于含 5 ml 丙酮液的测定瓶内, 用 LS3801 液体闪烁仪 (Beckman) 测定放射性强度。

1.4 试剂 丙氨酸-1; 氨基吡啶 (amidoride); 佛波醇 (4-phorbol, 12-myristate, 13-acetate, PMA) 用二甲亚砜 (DMSO) 溶解, 临用前加至  $1:1000$  (v/v) 比例加至无血清培养液。Staurosporine 为 PKC 抑制剂, 用无水乙醇溶解成  $10^{-4} \text{ mol/L}$ , 临用时以无血清培养液稀释。百日咳毒素 (PTX)、M199 培养基干粉、转铁蛋白和 5'-溴脱氧尿苷均为 Sigma 公司产品。 $^3\text{H}$ -亮氨酸放射性比活度为  $2.04 \text{ TBq/mol}$ , 中国科学院上海核技术公司产品; 胎牛血清为杭州四季青生物材料工程研究所产品, 批号 951107。

1.5 统计学处理 实验数据以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 进行秩和检验,  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 ET-1 对蛋白质合成速率、蛋白质含量和细胞表面积的影响

在无血清培养液中, ET-1 显著促进新生大鼠心室肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、增加蛋白质含量和心肌细胞表面积, 在  $10^{-10} \sim 10^{-7} \text{ mol/L}$  范围内呈明显的剂量依赖性, 在  $10^{-8} \text{ mol/L}$  时产生最大效应。 $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量和细胞表面积的  $\text{EC}_{50}$  分别为  $5.2 \times 10^{-10}$ 、 $5.2 \times 10^{-10}$  和  $7.3 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$  (图 1)。各浓度组的细胞数目无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 百日咳毒素的作用

百日咳毒素 (PTX) 是一种 G 蛋白的抑制剂。预先用 PTX ( $150 \text{ ng/ml}$ ) 处理心肌细胞 24 h, 能明显抑制 ET-1 促进心肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸的掺入, 蛋白质含量和细胞表面积的增加。单独给予 PTX ( $150 \text{ ng/ml}$ ) 对基础状态的心肌细胞蛋白质合成和细胞表面积无明显影响 (图 2)。PTX 对心肌细胞数无明显影响 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 蛋白激酶 C 的作用

Staurosporine (Stauro) 是蛋白激酶 C 抑制剂。单独用 Stauro ( $2 \text{ nmol/L}$ ) 处理对心肌细胞

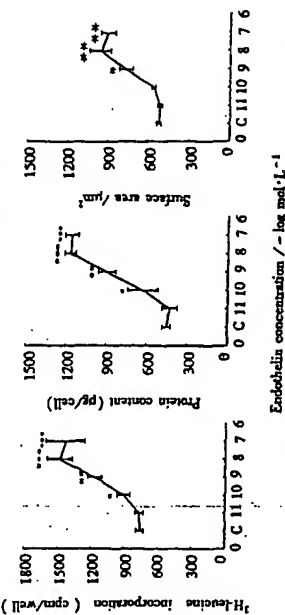


图 1 不同浓度的 ET-1 对培养新生大鼠心室肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量和细胞表面积的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of endothelin-1 on  $^3\text{H}$ -leucine incorporation, protein contents and cell surface area in cultured neonatal rat cardiomyocytes  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared with control group.

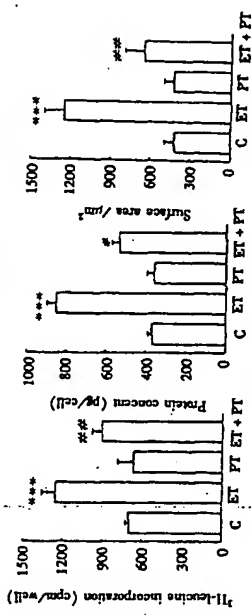


图 2 百日咳毒素对 ET-1 促进培养新生大鼠心室肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、增加蛋白质含量和细胞表面积的影响

Fig. 2 Effects of pertussis toxin on endothelin-1 induced promotion of  $^3\text{H}$ -leucine incorporation, the increase in protein contents and cell surface area in cultured neonatal rat cardiomyocytes  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared with control group.

表 1 蛋白激酶 C 激动剂 PMA 对培养心肌细胞的  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量和细胞表面积的影响

Table 1 Effects of protein kinase C agonist PMA on  $^3\text{H}$ -leucine incorporation, protein contents and cell surface area in cultured neonatal rat cardiomyocytes

	PMA					
	Control	8	7	6	5	4
$^3\text{H}$ -leucine incorporation (cpm/well)	697 $\pm$ 26	827 $\pm$ 68*	1069 $\pm$ 162**	1080 $\pm$ 213**	1080 $\pm$ 213**	1080 $\pm$ 213**
Protein content (pg/cell)	368 $\pm$ 22	481 $\pm$ 67*	758 $\pm$ 73**	852 $\pm$ 47**	852 $\pm$ 47**	852 $\pm$ 47**
Cell surface area ( $\mu\text{m}^2$ )	415 $\pm$ 74	628 $\pm$ 176*	995 $\pm$ 298**	1005 $\pm$ 251**	1005 $\pm$ 251**	1005 $\pm$ 251**

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , compared with control group.

$^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量和细胞表面积无明显影响。如用 Stauro (2 nmol/L) 预处理心肌细胞, 30 min 后再加  $10^{-8}$  mol/L ET-1, 可阻断 ET-1 对  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量和细胞表面积的增加作用 (图 3)。各组心肌细胞数也均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

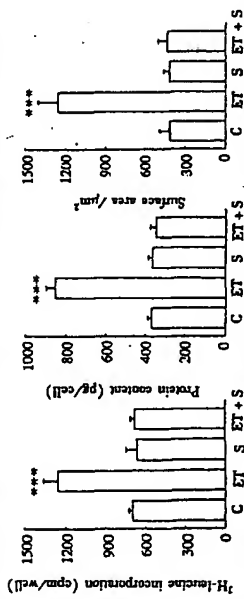


图 3 蛋白激酶 C 对 ET-1 促进培养新生大鼠心肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量和增加细胞表面积的影响

Fig. 3 Effects of protein kinase C on endothelin-1 induced promotion of  $^3\text{H}$ -leucine incorporation, and the increase in protein contents and cell surface area in cultured neonatal rat cardiomyocytes

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ , compared with control group.

蛋白激酶 C 激动剂, 佛波醇酯 (PMA) 本身促进无血清培养液培养的新生大鼠心肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、增加蛋白质含量和细胞表面积, 并呈剂量依赖性关系 (表 1)。

#### 2.4 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交换的作用

用  $10^{-4}$  mol/L 氨氯吡啶、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换的抑制剂预处理细胞 30 min, 可阻断  $10^{-8}$  mol/L ET-1 对心肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量的促进作用和细胞表面积的增加作用 (图 4)。单独用同样浓度的氨氯吡啶处理, 对心肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量和细胞表面积无明显影响。各组心肌细胞数也无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

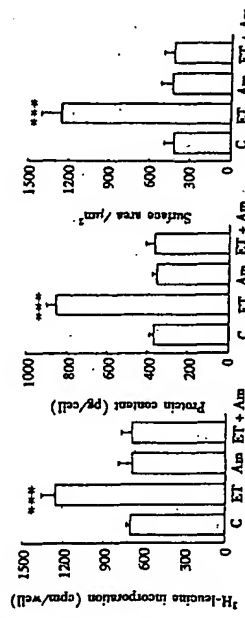


图 4 氨氯吡啶对 ET-1 促进培养新生大鼠心肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量和增加细胞表面积的影响

Fig. 4 Effects of amiloride on endothelin-1 induced promotion of  $^3\text{H}$ -leucine incorporation, and the increase in protein contents and cell surface area in cultured neonatal rat cardiomyocytes

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ , compared with control group.

有报道指出, ET-1 对  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换的激活是由蛋白激酶 C 介导的<sup>[5]</sup>。  $10^{-6}$  mol/L PMA 显著促进新生大鼠心肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、增加蛋白质含量和心肌细胞表面积;  $10^{-4}$  mol/L 氨氯吡啶对心肌细胞的  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入和细胞表面积无明显影响; 预先用  $10^{-4}$  mol/L 氨氯吡啶处理心肌细胞 30 min, 再加入  $10^{-6}$  mol/L PMA, 并不影响 PMA 的刺激心肌细胞的作用 (图 5)。

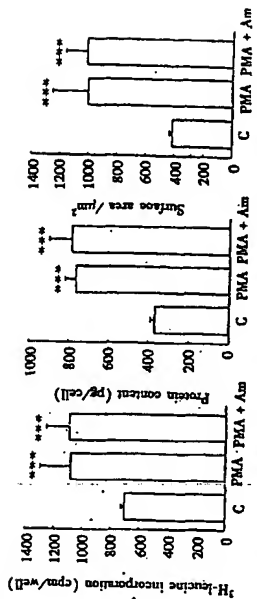


图 5 氨氯吡啶对蛋白激酶 C 激动剂促进培养新生大鼠心肌细胞  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、蛋白质含量和增加细胞表面积的影响

Fig. 5 Effects of amiloride on protein kinase C agonist, PMA promotion of  $^3\text{H}$ -leucine incorporation, the increase in protein contents and cell surface area in cultured neonatal rat cardiomyocytes

$^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ , compared with control group.

### 3 讨 论

本研究证明, 内皮素-1 对培养新生大鼠心肌细胞有肥大作用, 且呈剂量依赖性; 这种作用涉及百日咳毒素敏感的 G 蛋白、蛋白激酶 C (PKC) 和  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换。

许多资料指出, 心肌细胞是 ET-1 作用的主要靶细胞之一。心肌细胞有 ET-1 特异性受体, 通过 ET-1 受体激活, 影响心肌功能<sup>[2]</sup>。最近研究表明, ET-1 可作为心肌细胞的肥大因子, Ito 等<sup>[4]</sup>在培养新生大鼠心肌细胞上证实, ET-1 可诱导心肌细胞肥大, 同时增加肌内特异性基因如肌球蛋白轻链 2 (MLC2)、 $\alpha$ -肌动蛋白和肌钙蛋白 I 基因的转录水平。他们也观察到, ET-1 可诱导心肌细胞肥大反应, 表现为  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入加速、心肌细胞蛋白质含量增加和细胞表面积增大, 并在  $10^{-10} \sim 10^{-7}$  mol/L 浓度范围内呈剂量依赖性; ET-1 对心肌细胞的数目无明显的影响; 这些结果表明, ET-1 促进培养新生大鼠心肌细胞肥大而不引起心肌细胞增生。

虽然 ET 作用的细胞内信号转导途径进行了广泛的研究, 但是有关 ET-1 引起心肌细胞肥大的细胞内信号转导途径却未完全阐明。Kramer 等<sup>[6]</sup>报道, 百日咳毒素可抑制 ET 对心肌细胞的正性肌力作用和心肌细胞内的碱化作用; 我们观察到, 用百日咳毒素预处理心肌细胞可明显抑制 ET-1 促进  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、增加蛋白质含量和细胞表面积, 这就表明 ET-1 诱导的心肌细胞肥大反应涉及百日咳毒素敏感的 G 蛋白。我们的结果还表明, PKC 在 ET-1 诱导的心肌细胞肥大反应中起重要作用; 用 PKC 激活剂佛波醇 (PMA) 提高 PKC 的活性就可明显促进心肌细胞的  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入、增加蛋白质含量和细胞表面积, 且呈剂量依赖性; 用 PKC 抑制剂, Staurosporine 可完全阻断 ET-1 诱导的培养新生大鼠心肌细胞的肥大反应。

据报道, 细胞内碱化与血管平滑肌的增殖和肥大反应有密切关系<sup>[9]</sup>, ET-1 都可提高上述细胞内的 pH。细胞内的 pH 的稳定主要由细胞的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换调节的。我们观察到, 用  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换抑制剂, 氨基吡啶处理培养新生大鼠心肌细胞可阻断 ET-1 对  $^3\text{H}$ -亮氨酸的掺入和蛋白质合成的促进作用, 单独用氨基吡啶对基础状态的  $^3\text{H}$ -亮氨酸掺入和蛋白质合成无明显影响, 这些结果提示,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换机制在 ET-1 诱导心肌细胞肥大反应中有重要作用。ET-1 激活  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换的机制尚不完全清楚。在血小板上观察到 ET-1 激活  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换由 PKC 介导<sup>[10]</sup>; 还有报告指出, ET-1 通过激活 PKC 依赖  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换增强成年大鼠心室肌的收缩力<sup>[6]</sup>。但有许多证据表明, 包括内皮素在内的许多生长因子激活  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换是不依赖 PKC 激活, PMA 对  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换无作用<sup>[11]</sup>。我们观察到, PKC 激活剂 PMA 虽然明显促进心肌细胞的肥大反应, 但并不通过  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换, 当 PMA 与氨基吡啶共同孵育心肌细胞阻断  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换后, 并不影响 PMA 促进心肌细胞的蛋白质合成作用 (图 5)。可见, ET-1 与 PKC 都有诱导心肌细胞肥大作用, 但他们的作用机制不同, 可能 PKC 通过激活促分裂素活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 激酶 (MAPKK)-MAPK 级联, 调节细胞核内早期反应基因的转录, 最后导致心肌肥大, 而不通过  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换; 而内皮素-1 诱导心肌肥大作用则是通过与百日咳毒素敏感 G 蛋白耦联, 一方面激活 PKC, 由 PKC 激活 MAPKK-MAPK 级联影响细胞核诱导心肌肥大, 另一方面, 通过刺激与 PKC 无关的  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换机制, 使细胞碱化而诱导心肌细胞肥大反应<sup>[12]</sup>。

### 参考文献

- [1] Yanagisawa M, Kurihara H, Kumura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 1988, 332: 411-415
- [2] Hirata Y, Fukuda Y, Yoshimi H, et al. Specific receptor for endothelin in cultured rat cardiocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 160: 1438-1444
- [3] Ishikawa T, Yanagisawa M, Kumura S, et al. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol*, 1988, 255: H970-H973
- [4] Ito H, Hirata Y, Adachi S, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the myocardium of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiocytes. *J Clin Invest*, 1993, 92: 398-403
- [5] Ito H, Hirose M, Hirata Y, et al. Endothelin a receptor antagonist (BQ123) blocks cardiac hypertrophy provoked by pressure overload. *Circulation*, 1994, 89: 2198-2203
- [6] Ito H, Hirata Y, Hirose M, et al. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res*, 1991, 69: 209-215
- [7] Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat culture and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res*, 1982, 51: 787-801
- [8] Kramer BK, Smith TW, Kelly RA. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Circ Res*, 1991, 68: 269-279
- [9] Bobak A, Goorms A, Millar JA, et al. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, 1990, 258: C408-C415
- [10] Toury RM, Leiverson R, Schiffrin EL. Endothelin influences pH of human platelets through protein kinase C mediated pathways. *Throm Res*, 1995, 78: 55-65
- [11] Vigne P, Ladoux A, Frélin C. Endothelins activate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in brain capillary endothelial cells via a high affinity endothelin-3 receptor that is not coupled to phospholipase C. *J Biol Chem*, 1991, 266: 2952-2958
- [12] Sugden PH, Bogoyevich MA. Endothelin-1-dependent signaling pathways in the myocardium. *TCM*, 1996, 6: 87-94

## THE ROLE OF G PROTEIN, PROTEIN KINASE C AND $\text{Na}^+/\text{H}^+$ EXCHANGER IN ENDOTHELIN-1-INDUCED CARDIOMYOCYTE HYPERTROPHIC RESPONSES\*

WU BIN, WANG TING-HUAL, PAN JING-YUN,  
ZHU XIAO-NAN, ZHAN CHENG-YANG

(Department of Physiology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089)

### ABSTRACT

Endothelin-1 (ET-1) has been shown to be a potent growth factor and to induce cardiac hypertrophy. In the present study, we examined the role of G protein, protein kinase C (PKC) and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in ET-1-induced cardiac hypertrophy in cultured neonatal rat cardiac myocytes. ET-1 ( $10^{-10}$  ~  $10^{-7}$  mol/L) induced promotion of  $^3\text{H}$ -leucine incorporation, increase in cell protein content and cell surface area in a dose-dependent manner with  $\text{EC}_{50}$  value of  $5.2 \times 10^{-10}$ ,  $5.2 \times 10^{-10}$  and  $7.3 \times 10^{-10}$  mol/L respectively. All of these ET-1-induced cardiomyocyte hypertrophic responses were completely blocked by pretreatment with staurosporine (2 nmol/L), a protein kinase C inhibitor, and stimulated by 4-phorbol, 12-myristate, 13-acetate (PMA) ( $10^{-8}$  ~  $10^{-6}$  mol/L), a protein kinase C activator, in a dose-dependent manner. Pretreatment of amiloride ( $10^{-4}$  mol/L), a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange inhibitor completely inhibited the ET-1-induced, but not PMA-induced cardiomyocyte hypertrophic responses. The ET-1-induced increase in cardiomyocyte protein synthesis and cell surface area was significantly inhibited by pretreatment with pertussis toxin (150 ng/ml). These results suggest that ET-1-induced cardiomyocyte hypertrophy was linked with pertussis toxin sensitive G protein, and PKC and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange may be an important intracellular signaling transduction pathway during ET-1-induced cardiac hypertrophy in cultured neonatal rat cardiac myocytes.

**Key words:** endothelin-1; protein kinase C;  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange; G protein; cardiomyocyte; hypertrophic responses

\* Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39470810) and Higher Education Doctoral Science Foundation of China (No. 93151)